

氏名	窪田 慈
学位(専攻分野)	博士 (薬学)
学位記番号	薬博第448号
学位授与の日付	平成12年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科医療薬科学専攻
学位論文題目	脳虚血における神経細胞保護を目的とした亜鉛キレート化合物の開発に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 佐治英郎 教授 佐藤公道 教授 赤池昭紀

### 論文内容の要旨

虚血時、脳内ではグルタミン酸が過剰に遊離され、それがグルタミン酸受容体を刺激することにより細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇をもたらす、神経細胞死が起こると考えられている。特に、グルタミン酸受容体のサブタイプのひとつである N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体は、この脳虚血時におけるグルタミン酸神経毒性の発現に重要な役割を果たしていると言われている。実際、NMDA 受容体拮抗薬であるジゾシルピン (MK-801) は脳虚血実験動物モデルにおいて梗塞巣体積を縮小することが報告されているが、この化合物は精神異常行動や大脳皮質神経細胞の空胞化などを起こすことから、臨床使用には至っていない。

一方、 $\text{Zn}^{2+}$  は NMDA 受容体の亜鉛結合部位に結合し、NMDA 受容体の活性を抑制することが報告されている。しかし、遊離の  $\text{Zn}^{2+}$  は血液-脳関門を通過することができないため、脳虚血病態における  $\text{Zn}^{2+}$  の効果は明らかでない。そこで著者は、血液-脳関門通過性を有し NMDA 受容体の亜鉛結合部位に結合する亜鉛化合物を設計し、その脳虚血障害の治療における有効性を検討することを計画した。そこで、最近ジチオセミカルバゾン (DTS) 誘導体と  $\text{Cu}^{2+}$  とのキレート化合物に脳への高い移行性を示すものが見いだされたこと、また  $\text{Zn}^{2+}$  は DTS 誘導体とキレート形成が可能なることに着目して、DTS を配位基とする種々の亜鉛キレート化合物を合成し、それらの脳移行性を検討した。

キレート化合物は  $\text{Zn}^{2+}$  と DTS 誘導体とを pH 4~7 で混合することによって生成し、得られた亜鉛キレート化合物の脳への移行性は、マウスおよびラットを用いて臓器摘出法およびオートラジオグラフィにより調べた。その結果、これらの亜鉛キレート化合物の脳への移行性は脂溶性と相関し、脂溶性が高いものほど脳への移行性が高いこと、また、検討した亜鉛キレート化合物のなかで 2, 3-butanedione bis (N<sup>4</sup>-dimethylthiosemicarbazone) zinc (Zn-ATSM<sub>2</sub>) が最も高く脳へ取り込まれることを見いだした。また、これらの亜鉛キレート化合物の NMDA 受容体亜鉛結合部位への結合親和性を、NMDA 受容体イオンチャンネルの開口時にチャンネル内部に結合する <sup>3</sup>H-MK 801 の結合阻害能を指標として測定することにより検討した結果、いずれの亜鉛キレート化合物も  $\text{Zn}^{2+}$  とほぼ同程度に <sup>3</sup>H-MK 801 の結合を阻害することを見いだした。

また、ラット胎仔由来初代培養海馬細胞を用いて、これらの亜鉛キレート化合物のグルタミン酸神経毒性に対する作用を検討した結果、いずれの化合物も  $\text{Zn}^{2+}$  と同程度の神経保護作用を示し、またその作用は濃度依存的であった。さらに、グルタミン酸により誘発される細胞への  $\text{Ca}^{2+}$  の流入をこれらの亜鉛キレート化合物は阻害することを認めた。このことより、DTS 誘導体の亜鉛キレートは、グルタミン酸神経毒性に対して NMDA 受容体への作用を介して神経細胞保護作用を示すことが示唆された。

さらに、ラットを用いて、中大脳動脈閉塞モデルを作成し、脳への高い取り込みを示した Zn-ATSM<sub>2</sub> について、脳虚血障害に対する神経保護作用を  $\text{Zn}^{2+}$  と比較検討した。Zn-ATSM<sub>2</sub> または  $\text{Zn}^{2+}$  を閉塞 30 分前に静脈内投与し、1 時間閉塞した後、再灌流して 24 時間後に脳切片を作成し、これを組織染色後画像解析することにより脳における梗塞巣体積を測定したところ、 $\text{Zn}^{2+}$  は梗塞巣体積の縮小作用を示さなかったが、Zn-ATSM<sub>2</sub> は梗塞巣体積を有意に縮小させた。さらに、再灌流直

後に静脈内投与した場合も Zn-ATSM<sub>2</sub> は梗塞巣体積縮小作用を示した。これらの結果から、Zn-ATSM<sub>2</sub> は末梢投与により、脳虚血病態に於いて神経細胞保護作用があることが示された。また、正常ラットに Zn-ATSM<sub>2</sub> を静注後、脳切片の組織学的検討を行った結果、神経細胞の空砲化などの組織学的変化は生じていないことを認めた。

以上、本研究は、脳虚血障害の治療における亜鉛キレート化合物の有効性に関する基礎的知見を得たものであり、脳虚血障害治療薬開発にひとつの新しい方向性を提起するものと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

虚血時、脳内ではグルタミン酸が過剰に遊離され、それがグルタミン酸受容体を刺激することにより細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の上昇をもたらす、神経細胞死が起こると考えられている。そして、この神経細胞死に、グルタミン酸受容体のサブタイプのひとつである N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体が重要な役割を果たしていると言われている。一方、Zn<sup>2+</sup> は NMDA 受容体の亜鉛結合部位に結合し、NMDA 受容体の活性を抑制することが報告されている。しかし、遊離の Zn<sup>2+</sup> イオンは血液-脳関門を通過することができないため、脳虚血病態における Zn<sup>2+</sup> の効果は明らかでない。このような背景のもと、本論文は、血液-脳関門通過性を有し、脳移行後、脳内の NMDA 受容体の亜鉛結合部位に結合する亜鉛化合物を設計、合成し、その脳虚血障害の治療における有効性を検討したものである。

著者は、まず、最近ジチオセミカルバゾン (DTS) 誘導体と Cu<sup>2+</sup> とのキレート化合物に脳への高い移行性を示すものが見いだされたこと、また Zn<sup>2+</sup> は DTS 誘導体とキレート形成が可能なことに着目して、DTS を配位基とする種々の亜鉛キレート化合物を合成し、それらの脳移行性を検討した。その結果、キレート化合物は Zn<sup>2+</sup> と DTS 誘導体とを pH 4~7 で混合することによって速やかに生成し、得られた亜鉛キレート化合物の脳への移行性は、脂溶性と相関し、脂溶性が高いものほど脳への移行性が高いこと、また、検討した亜鉛キレート化合物のなかで 2,3-butanedione bis (N 4-dimethylthiosemicarbazono) zinc (Zn-ATSM<sub>2</sub>) が最も高く脳への取り込まれることを見いだした。

次いで、これらの亜鉛キレート化合物の NMDA 受容体亜鉛結合部位への結合親和性を、NMDA 受容体イオンチャンネルの開口時にチャンネル内部に結合する<sup>3</sup>H-MK 801 の結合阻害能を指標として測定することにより検討した結果、いずれの亜鉛キレート化合物も Zn<sup>2+</sup> とほぼ同程度に<sup>3</sup>H-MK 801 の結合を阻害することを見いだした。また、ラット胎仔由来初代培養海馬細胞を用いて、これらの亜鉛キレート化合物のグルタミン酸神経毒性に対する作用を検討した結果、いずれの化合物も Zn<sup>2+</sup> と同程度の神経保護作用を示し、またその作用は濃度依存性であった。さらに、グルタミン酸により誘発される細胞への Ca<sup>2+</sup> の流入をこれらの亜鉛キレート化合物は阻害することを認めた。このことより、DTS 誘導体の亜鉛キレートは、グルタミン酸神経毒性に対して NMDA 受容体への作用を介して神経細胞保護作用を示すことが示唆された。

さらに、ラットを用いて、中大脳動脈閉塞モデルを作成し、脳への高い取り込みを示した Zn-ATSM<sub>2</sub> について、脳虚血障害における梗塞巣体積の縮小作用を Zn<sup>2+</sup> と比較検討した。その結果、Zn<sup>2+</sup> は梗塞巣体積の縮小作用を示さなかったが、Zn-ATSM<sub>2</sub> は梗塞巣体積を有意に縮小させた。さらに、再灌流直後に静注した場合も Zn-ATSM<sub>2</sub> は梗塞巣体積縮小作用を示した。これらの結果から、Zn-ATSM<sub>2</sub> は末梢投与により、脳虚血病態に於いて神経細胞保護作用があることが示された。

以上、本研究は、脳虚血障害の治療における亜鉛の効果および亜鉛キレート化合物の有効性に関する基礎的知見を得たものであり、脳虚血障害治療薬開発にひとつの新しい方向性を提起するものと評価される。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。

更に、平成 12 年 3 月 1 日論文内容とそれに関連した口答試問を行った結果合格と認めた。